

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19020

研究課題名（和文）リバスクラリゼーションにおける微小環境の解明：なぜ象牙芽細胞が分化しないのか

研究課題名（英文）Microenvironment in pulp revascularization: Elucidation of the mechanisms that prevents odontoblast differentiation

研究代表者

枝並 直樹 (edanami, naoki)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：80804567

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究で様々な根尖部組織残存量の歯にリバスクラリゼーションを行い、治癒形態を観察した結果、根尖部組織残存量に応じて、①：象牙質とオステオデンティンの形成を伴うパターン、②：オステオデンティンのみの形成を伴うパターン、③：オステオデンティンとセメント質様硬組織の形成を伴うパターン、④：セメント質様硬組織と骨様硬組織の形成を伴うパターンの4パターンが生じる事が明らかになった。また、①と②のパターンでは歯髄細胞が、③と④のパターンでは歯根膜細胞が根管軟組織を構築していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、根尖部組織残存量が少ない場合には、歯根膜細胞による根管軟組織の置換が生じることがリバスクラリゼーションで象牙芽細胞が分化しない原因であると言える。一方で、根尖部組織が一定以上残存している場合には歯髄様組織が再構築されるものの、微小環境が整わないことによって象牙芽細胞分化が起こらず、オステオデンティン形成に陥ることが示された。これらの結果はリバスクラリゼーション後に象牙質形成を誘導するための戦略を検討して行く上で重要な所見である。

研究成果の概要（英文）：This study investigated the impact of remnant healthy or fully functional pulp and apical tissue on healing patterns after regenerative endodontic procedures. Teeth with 0.81-0.91 mm of remnant pulp healed with pulp-like tissue, dentin, and osteodentin-like mineralized tissue (OSD); teeth with 0.60-0.63 mm of remnant pulp healed with pulp-like tissue and OSD; teeth with 0.13-0.43 mm of remnant pulp healed with periodontal ligament (PDL)-like tissue, OSD, and cementum-like mineralized tissue (CEM); and teeth with disorganization of pulp and apical tissues at 0.15-0.38 mm beyond the root apex healed with PDL-like tissue, CEM, and intracanal bone.

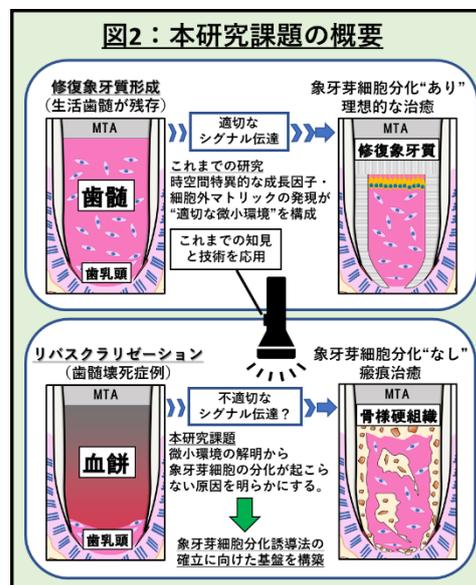
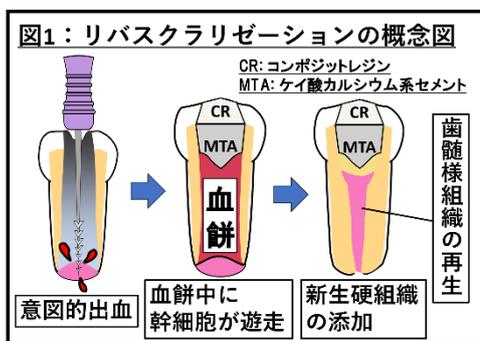
研究分野：歯科保存学

キーワード：リバスクラリゼーション 象牙質 オステオデンティン セメント質 歯槽骨 歯髄細胞 歯根膜細胞

1. 研究開始当初の背景

根未完成歯の歯髄壊死・根尖性歯周炎は、学童期の小児に発症するため、患歯を長期に保存する必要が極めて高い。一方で従来の歯内療法では、治療後も歯根象牙質が菲薄なままとなり、その脆弱性から長期予後に不安を残す。近年、再生歯内療法(リバスクラリゼーション:図1)が報告され、根尖部の幹細胞を誘引することで、根管内に新生硬組織が添加されることが明らかになった。これにより根未完成歯の“理想的な歯内療法”は完成に至ったかに思われたが、その後の研究により、リバスクラリゼーションで形成される新生硬組織の大半が象牙質ではなく骨様硬組織であるという問題点が新たに浮上してきた。骨様硬組織による癒痕治療では、間隙からの細菌侵入や、将来的な歯根吸収が懸念されるため、象牙質形成が導かれるようにリバスクラリゼーションの治療術式を発展させることが不可避の課題となっている。

この目標を達成するためには、そもそも、なぜリバスクラリゼーションで象牙芽細胞が分化しないのかの究明が先決である。しかしながら現状では、その原因物質の候補すら絞り込まれていない。リバスクラリゼーションにおいて、正常な修復象牙質形成過程とは異なる発現動態を示す成長因子や細胞外マトリックスが見つければ、その物質の過不足が象牙芽細胞の分化不全につながっている可能性が高い。そこで本研究課題は、『リバスクラリゼーションと修復象牙質形成過程における微小環境の差異を明らかにすることにより、リバスクラリゼーションで象牙芽細胞の分化が起こらない原因物質の究明が可能ではないか』という問いに答えるべく計画した(図2)。



2. 研究の目的

本研究は当初、正常歯髄または修復象牙質形成過程との比較からリバスクラリゼーションの治療過程特異的な成長因子・細胞外マトリックス発現を見つけ出し、リバスクラリゼーションの治療術式の発展に役立てることを目的としていた。しかしながら、研究開始後は、歯髄・根尖部組織の残存量に応じて、治療経過が大きく異なることが判明した。このため、計画を変更し、歯髄・根尖部組織の残存量が治療形態に与える影響を先に解明することとした。

3. 研究の方法

(1) ラット臼歯に対するリバスクラリゼーション処置

本研究は新潟大学動物実験倫理委員会の承認を得て実施した (SA 00213)。5 週齢の雄性 Wistar 系ラットに全身麻酔を施し、実体顕微鏡視野下で以下の処置を行った。下顎第一臼歯にラバーダム防湿を行い、直径 0.6mm のカーバイドバーを用いて髄腔開拓を行った。その後、近心根管を #25 K ファイルを用いて、4 段階の作業長で拡大形成した。この作業長は事前に調査された平均歯根長に基づいて、約 0.8mm、0.5mm、または 0.2mm の組織が根管に残るように、または 0.2mm の組織が根尖を超えて除去されるように設定した。続いて、根管内に CT 造影剤を填入した状態でマイクロ CT 撮影を行い、根尖部組織残存量を評価した。その後、根管を生理食塩水にて洗浄し、10 号 H ファイルでオーバーインスツルメンテーションを行うことで、根管内に血餅を形成させた。血餅上にケイ酸カルシウムセメント (ProRootMTA) を貼付し、コンポジットレジンにて窩洞を封鎖した。観察期間は 4 週間とし、灌流固定後に組織を摘出した。

(2) 組織学的解析

通法に従ってパラフィン組織切片を作製し、H-E 染色、TRAP 染色ならびに抗 Dentin sialoprotein (DSP: clone 2C12.3; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), nestin (clone rat-

401; Sigma-Aldrich), Periostin (polyclonal, BioVendor, Karasek, Czech Republic), Cytokeratin 抗体 (polyclonal, Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan) を用いた免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) 研究結果

象牙質、オステオデンティン、セメント質様硬組織、骨様硬組織、歯髄細胞、歯根膜細胞は以下の条件で区別された。

① 象牙質

細胞封入なし、細管構造あり、DSP 陽性、nestin 陽性象牙芽細胞の表在あり

② オステオデンティン

細胞封入あり、細管構造なし、DSP 陽性

③ セメント質様硬組織

細胞封入あり、細管構造なし、DSP 陰性、TRAP 陽性破骨細胞の表在なし

④ 骨様硬組織

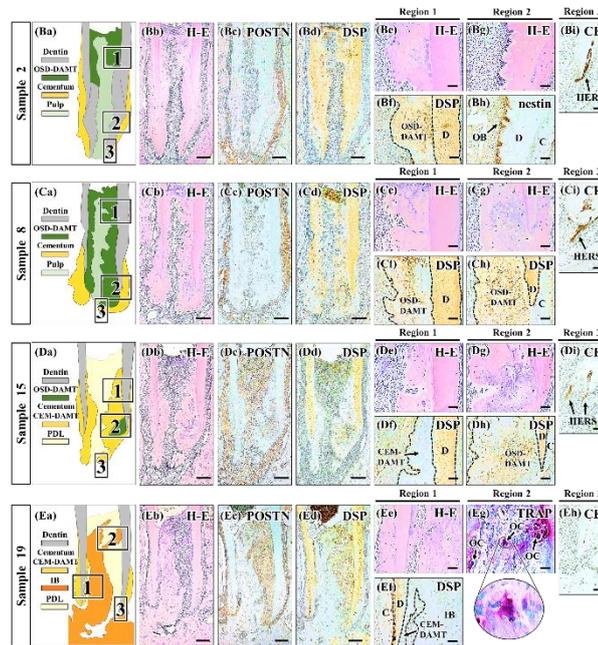
細胞封入あり、細管構造なし、DSP 陰性、TRAP 陽性破骨細胞の表在あり

⑤ 歯髄細胞

Periostin 陰性

⑥ 歯根膜細胞

Periostin 陽性



Edanami N et al. Sci Rep. 2020 より引用

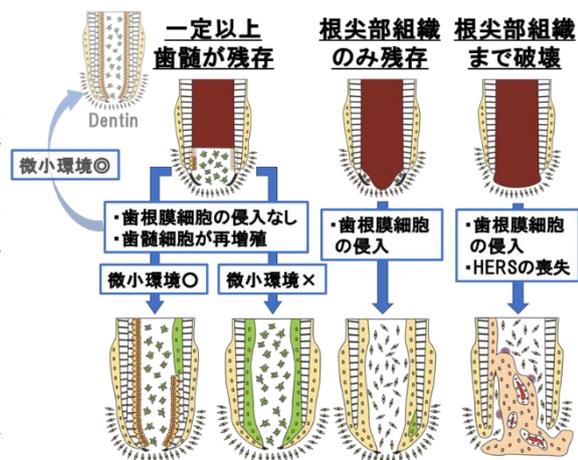
処置歯の組織学的解析からは根尖部組織残存量に応じて、①：象牙質とオステオデンティンの形成を伴うパターン (0.81~0.91mm の歯髄が残存していた時)、②：オステオデンティンのみの形成を伴うパターン (0.60~0.63mm の歯髄が残存していた時)、③：オステオデンティンとセメント質様硬組織の形成を伴うパターン (0.13~0.43mm の歯髄が残存していた時)、④：セメント質様硬組織と骨様硬組織の形成を伴うパターン (根尖を 0.15~0.38mm 越えて拡大した時) の 4 パターンが生じる事が明らかになった。また、①と②のパターンでは歯髄細胞が、③と④のパターンでは歯根膜細胞が根管内軟組織を構築していた。④のパターンのみで Cytokeratin 陽性の Hertwig 上皮鞘の喪失が認められた。

REPで複数の治癒形態が生じるメカニズム

(2) 考察

本研究で様々な根尖部組織残存量の歯にリバスクリライゼーション (REPs) を行い、治癒形態を観察した結果、REPs 後の治癒形態は、施術時における歯髄および根尖部組織の残存状態に影響されることが示された。また、歯根膜細胞の根管内侵入が起こらなくても異所性硬組織 (オステオデンティン) が形成されることが明らかになった。さらに、歯根膜細胞の根管内侵入が起こるとセメント質様硬組織の形成が生じるが、必ずしも歯槽骨の根管内侵入は伴わないことが明らかになった。一方で、歯槽骨の根管内侵入は Hertwig 上皮鞘が傷害された場合に生じることが示唆された。

根尖部組織が一定以上残存している場合には歯髄様組織が再構築されるものの、オステオデンティン形成に陥る場合があり、この条件下においては微小環境を整えること (成長因子の添加等) により、象牙芽細胞分化・象牙質形成を誘導できると考えられる。また、本研究の目的とは異なるが、Hertwig 上皮鞘の欠損が、歯槽骨の根管内への伸長を可能としている可能性が示された点も興味深い。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Naoki Edanami, Kunihiko Yoshiba, Mari Shirakashi, Razi Saifullah Ibn Belal, Nagako Yoshiba, Naoto Ohkura, Aiko Tohma, Ryosuke Takeuchi, Takashi Okiji, Yuichiro Noiri | 4. 巻 10(1) |
| 2. 論文標題 Impact of remnant healthy pulp and apical tissue on outcomes after simulated regenerative endodontic procedure in rat molars | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 20967 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-78022-w. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 枝並 直樹, 白柏 麻里, 吉羽 邦彦, 大倉 直人, 吉羽 永子, 遠間 愛子, 竹内 亮祐, 野杵 由一郎 |
| 2. 発表標題 なぜRegenerative endodontic proceduresは多様な治癒形態を生じさせるのか ラット根未完成臼歯における免疫組織学的研究 |
| 3. 学会等名 日本歯科保存学会151回学術大会 |
| 4. 発表年 2019年～2020年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|